Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg a.d. Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. W. Straub

VERHALTEN DER AMINOSÄURENKONZENTRATIONEN IN DEN VORDEREN AUGENABSCHNITTEN NACH EPITHELABRASIO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

JÖRG LEUBE
aus Mönchengladbach

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg a.d. Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. W. Straub

VERHALTEN DER AMINOSÄURENKONZENTRATIONEN IN DEN VORDEREN AUGENABSCHNITTEN NACH EPITHELABRASIO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

JÖRG LEUBE

aus Mönchengladbach

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 27. 10. 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin

Dekan : Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent : Prof. Dr. med. L. Welge-Lüssen
Correferent : Prof. Dr. med. M. Reim

Inhaltsverzeichnis

1.	Aufbau und Funktion von Hornhaut und Kammerwasser	1
1.1.	Hornhaut	1
1.2.	Kammerwasser	4
2.	Biochemie der vorderen Augenabschnitte	5
2.1.	Kohlenhydrate und ihr Stoffwechsel	5
2.2.	Lipide	7
2.3.	Aminosäuren	8
3.	Abrasio corneae	9
4.	Methodik	10
4.1.	Versuchstiere und Operation	10
4.2.	Probengewinnung	10
4.3.	Aufarbeitung der Proben	11
4.4.	Analyse	12
4.5.	Statistische Berechnung	15
5.	Ergebnisse	17
5.1.	Klinik	17
5.2.	Aminosäuren	18
5.2.1.	Normalwerte	18
5.2.1.1.	Epithel	18
5.2.1.2.	Stroma	18
5.2.1.3.	Kammerwasser	18
5.2.1.4.	Plasma	20
5.2.2.	AS-Konzentrationen nach Abrasio	20
5.2.2.1.	Stroma nach Abrasio	21
5.2.2.2.	Kammerwasser nach Abrasio	21
5.2.2.3.	Vergleich der beiden Kompartimente	24

6. Diskussion 24
6.1. Klinik 24
6.2. Aminosäuren 25
6.2.1. Normalwerte 25
6.2.2. AS-Konzentrationen nach Abrasio 27

7. Zusammenfassung 35

8. Methodischer Anhang 37
8.1. Tabellen 38
8.2. Geräte 44
8.3. Chemikalien 45

9. Literaturverzeichnis 46

1. Aufbau und Funktion von Hornhaut und Kammerwasser

1.1. Hornhaut

Die Cornea bildet zusammen mit der Sklera die äußere Augenhaut und hat damit im wesentlichen zwei Aufgaben zu erfüllen - Stabilität und Transparenz.
Das Auge ist wegen seiner exponierten Lage trotz des Schutzes durch die knöchernen Orbitawandungen vielen Gefahren ausgesetzt. Cornea und Sklera bieten einen weitgehenden Schutz vor diesen. Außerdem verleihen sie dem Bulbus - trotz dauernden Zuges der Augenmuskeln bei den Blickbewegungen - eine konstante Form und ermöglichen damit eine ständig scharfe Abbildung auf der Retina. Eine solche Abbildung ist wiederum nur möglich, wenn die Hornhaut in hohem Maße lichtdurchlässig ist. Für die Transparenz der Cornea ist eine besondere, konstante Struktur des Stromas (siehe da) notwendig.

Die Größe der menschlichen Hornhaut beträgt etwa 11.7 mm im Durchmesser und etwa o.8 mm (Zentrum) bzw. 1.1 mm (Limbus) in der Dicke (Rohen 1962). Die Cornea besteht aus folgenden Schichten:

Epithel (etwa 10% der Dicke)
Bowmansche Membran
Stroma (etwa 90% der Dicke)
Descemetsche Membran
Endothel

Das Epithel begrenzt die Hornhaut nach außen. Es handelt sich um ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel. Schwarz (1972) gibt - von der Basalmembran nach außen - eine Lage kubischer Basalzellen, zwei Lagen polygonaler Zellen und zwei Lagen abgeplatteter Zellen an. Sämtliche Zellen sind durch Desmosomen miteinander verbunden.

Hierbei handelt es sich um Verdickungen der Zellmembran (Haftscheiben), in die intracelluläre Filamente einstrahlen. Der Intercellularspalt ist an diesen Stellen auf 200 Å verengt.
Das Epithel regeneriert sich von der untersten Schicht her, den teilungsfähigen Basalzellen. In etwa 4 - 7 Tagen wandern kubische Zellen unter Abflachung ihrer Form bis an die Oberfläche und werden dort abgestoßen. Die basalen Zellen sitzen auf einer 270 Å dicken, also lichtmikroskopisch nicht sichtbaren Basalmembran. Die oberflächlichen Zellen - sie sind heller als die übrigen - tragen elektronenmikroskopisch erkennbare Mikrovilli. Diese sind nach Pedler (1962) für die Haftung des Tränenfilms von besonderer Bedeutung.

Die Bowmansche Membran imponiert nur lichtmikroskopisch als Membran. Unter dem Elektronenmikroskop findet man jedoch eine 10 - 20µ dicke Schicht, die aus Fibrillen und Kittsubstanz besteht (Schwarz 1972). Bei den Fibrillen handelt es sich um Kollagene (Querstreifung 200 Å), bei der Kittsubstanz um Glykosaminoglykane.

Das Stroma der Hornhaut ist gleichzeitig ihr Parenchym, d.h. Träger der wichtigen Organfunktionen. Da es sich um eine besondere Form von Bindegewebe handelt, besteht es aus Zellen und Fasern, die allerdings in besonderer Anordnung vorliegen. Die Zellen, die durch Fortsätze miteinander verbunden sind, enthalten reichlich Mitochondrien zur Energiebereitstellung und endoplasmatisches Reticulum (ER) für die Synthese des Kollagens und der Kittsubstanz. Die Fasern sind als flache Lamellen parallel zur Oberfläche angeordnet. In den Lamellen wiederum verlaufen die Fibrillen parallel. Sie haben eine sehr geringe Dicke von 20 - 30 mµ . Die Packung der Fibrillen ist nicht kristallin, sondern nach Schwarz (1972) "quasiregulär,quasizufällig".

Die Kittsubstanz besteht aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen. Die enthaltenen Mucopolysaccharide sind dabei Keratinsulfat, Chondroitin und Chondroitin-4-sulfat, die sich durch ein großes Wasserbindungsvermögen auszeichnen. Brücken zwischen den einzelnen Fibrillen sorgen für einen konstanten Abstand.
Die Festigkeit der Hornhaut ist aus der straffen Struktur leicht verständlich. Wie steht es jedoch mit ihrer Transparenz? Reim (1972) hält ein ausgewogenes Zusammenspiel biologischer Faktoren für notwendig. So ist der Wassergehalt von ausschlaggebender Bedeutung - ein Corneaödem führt zur Trübung der Hornhaut. Auch fand Reim einen positiven Zusammenhang zwischen ATP/ADP-Quotient und Transparenz. Schwarz (1972) hält außerdem für erforderlich erstens einen geringen Durchmesser der Kollagenfibrillen (etwa 1/10 der Lichtwellenlänge),zweitens eine geringe Schwankung dieses Durchmessers, drittens einen geringen Unterschied im Brechungsindex zwischen Fibrillen und Kittsubstanz und schließlich viertens die "quasiregulläre, quasizufällige" Packung der Kollagenfibrillen.

Die Descemetsche Membran ist eine regelmäßig aufgebaute Schicht aus Kollagen zwischen Hornhautstroma und Endothel.

Das Endothel, das von einigen Autoren auch als Mesothel bezeichnet wird, ist ein einschichtiges,flaches Epithel. Die polygonalen Zellen besitzen Mikrovilli. Die Intercellularspalte sind durch Schlußleisten nach außen abgegrenzt. Dadurch ist der unkontrollierte Substanztransport (z.B. Wasser und Salze) erschwert. Für den transcellulären Transport sprechen auch zahlreiche pinocytotische Vesikel.

Die Stoffwechselwege der Hornhaut unterscheiden sich im Prinzip nicht von denen anderer Gewebe. Abweichend sind nach Graymore (1970) die Zusammensetzung der

Mucopolysaccharide sowie funktionell die Gefäßlosigkeit der Cornea und - durch die besondere anatomische Lage - die niedrige Temperatur im Vergleich zum Blut.

Die Ernährung der Hornhaut erfolgt nahezu ausschließlich über das Kammerwasser. Durch Versuche von Reim und Schütte (1972, Austausch des Kammerwassers durch Luft bzw. Silikon) sowie von Turss und Schebitz (1972, Einlegen einer intralamellären Membran in die Cornea) zeigte sich, daß die Hornhaut vom Kammerwasser aus mit Glucose versorgt wird. Laktat wird entsprechend ins Kammerwasser abgegeben. Die Randschlingengefäße sind nach Turss an der Versorgung nicht beteiligt. Lediglich der Tränenfilm spielt noch eine Rolle, und zwar im Gasaustausch des Epithels mit der Luft (Graymore 1970). Von Haftschalenversuchen ist bekannt, daß z.B. nach zu festem Sitz schnell ein Epithelödem auftritt.

1.2. Kammerwasser

Das Kammerwasser ist eine klare, eiweißarme Flüssigkeit, die vom Ciliarkörper in die Hinterkammer teilweise diffundiert, teilweise sezerniert wird, dann durch die Pupille in die Vorderkammer gelangt und über den Schlemmschen Kanal im Kammerwinkel abfließt. Das Volumen der Vorderkammer beträgt beim Menschen o.35 ml (Steindorf 1947) - die Hinterkammer ist vergleichsweise sehr klein. Die Sekretionsrate beträgt 2.2 mm^3/min (Friedenwald 1932). Das Kammerwasser ist sowohl für die Ernährung der Hornhaut (siehe oben) wie auch für die Höhe des intraoculären Druckes von entscheidender Bedeutung.
Die Zusammensetzung des Kammerwassers entspricht im wesentlichen der des Blutes, mit Ausnahme der Proteine, die etwa 100x niedriger konzentriert sind, wobei die einzelnen Fraktionen sich prozentual in etwa gleichen.

Ascorbat, Lactat und Pyruvat sind im Kammerwasser etwas höher konzentriert, Calcium dagegen niedriger. Auch der Sauerstoffpartialdruck ist etwa 2 - 3x niedriger als im Plasma (Davson 1962, Graymore 1970).

2. Biochemie der vorderen Augenabschnitte

2.1. Kohlenhydrate und ihr Stoffwechsel

Der Kohlenhydratstoffwechsel der Cornea scheint sich, zumindest qualitativ, nicht von dem anderer Gewebe zu unterscheiden. Henninghausen, Schmidt-Martens und Reim wiesen in Hornhäuten von Kaninchen, Schweinen, Rindern und Menschen Enzymaktivitäten aus den Bereichen des Embden-Meyerhof-Abbaues, der Glykolyse, des Citratcyclus und des Pentosephosphatshunts nach. Im Epithel waren die Aktivitäten dabei höher als im Endothel.

Die Konzentrationen einiger Kohlenhydrate in gesunden Augen wurden von verschiedenen Untersuchern bestimmt.

Tab. 1 Kohlenhydratkonzentrationen in gesunden Kaninchenaugen in µMol/g (Reim, Schütte)

	Epithel	Stroma	Ka.-Wasser	Plasma
Glucose	4.4	3.1	6.9	7.2
Fruktose	2.0	o.5	o.2	o.o7
Laktat	55.2			
Pyruvat	1.3			

Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels wurden auch unter verschiedenen pathologischen Bedingungen untersucht. Nach Einsetzen einer intralamellären Membran

(Reim) sank der Glucosegehalt der peripheren Cornea ab. Während eines O_2-Entzugs kam es zu einem deutlichen Anstieg der Laktatkonzentration, des Laktat/Pyruvat-Quotienten sowie der Konzentrationen von Glucose-6-phosphat und Fruktosediphosphat, während der Gehalt an ATP deutlich abfiel. Reim beobachtete gleichzeitig eine massive Hornhauttrübung. Turss bemerkte einen Abfall des Glucosegehaltes von Hornhaut und Kammerwasser nach Laugenverätzung. Schütte wies einen steilen Konzentrationsanstieg von Glucose und Fruktose in Hornhaut und Kammerwasser nach, nachdem er die jeweilige Substanz intravenös infundiert hatte.Diese Reaktion blieb jedoch aus, wenn er vorher einen künstlichen Pupillarblock gesetzt hatte.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sprechen dafür, daß der Kohlenhydratstoffwechsel für die Energiegewinnung der Hornhaut sehr wichtig ist. Die Versorgung der Cornea mit Glucose erfolgt vom Kammerwasser aus, während die Tränenflüssigkeit, die beim Menschen nur 1/10 des Stromaglucosegehaltes aufweist (Reim), keine Rolle zu spielen scheint.

Boeck (1971) beobachtete 12 h nach Epithelabrasio im Corneaparenchym einen leichten Abfall der Glucosekonzentration, die Werte von Lactat und Pyruvat waren hochsignificant gefallen. Nach 24 h hatte sich die Glucosekonzentration wieder normalisiert, während Lactat und Pyruvat immer noch stark erniedrigt waren. Im Kammerwasser war die Lactatkonzentration nach 24 h ebenfalls gesunken, während sich die Werte von Glucose und Pyruvat im Normbereich bewegten. Boeck erklärt seine Ergebnisse mit einem vermehrten Lactat-Abstrom nach Wegfall des Epithels als Diffusionsgrenze sowie mit einer verminderten Lactat-Produktion durch Fehlen des Epithels als Hauptlactatproduzent. Auch die Fruktosekonzentration in der Cornea fällt nach Abrasio am zweiten,dritten und besonders am

Tab. 2 Kohlenhydratkonzentrationen nach Abrasio (Boeck)

	Lactat		Pyruvat		Glucose	
	12 h	24 h	12 h	24 h	12 h	24 h
Cornea	--	--	--	--	-	ø
Ka.-Wasser		-		ø		ø

vierten und fünften Tag ab und normalisiert sich - im Gegensatz zur Glucose - innerhalb von fünf Tagen nicht (Schütte 1976).

2.2. Lipide

Über Lipide und deren Stoffwechsel in den vorderen Augenabschnitten liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Schmidt-Martens (1972) fand in der gesamten Cornea freie Fettsäuren in einer Konzentration von 226 µMol/g Frischgewicht, während der Gehalt des Hornhautepithels mit 275 µMol/g etwas höher lag. Die Konzentration der freien Fettsäuren im Kammerwasser betrug 11 nMol/ml . In Hornhaut und Kammerwasser überwogen mit circa 80% die C_{16}- und C_{18}-Carbonsäuren, während alle anderen höher- oder niedermolekularen Fettsäuren nur etwa 20% ausmachten.

Das Kammerwasser besitzt nach Schmidt-Martens folgendes Lipidspektrum: 25% Phosphatide, 24% Triglyceride, 21% Cholesterinester, 19% freie Fettsäuren und 11% Cholesterin. Die freien Fettsäuren des Kammerwassers sollen drei verschiedene Bedeutungen haben: Sie inhibieren Schlüsselenzyme der Glykolyse im Corneaendothel und wirken deshalb regulativ auf den Glucoseabbau, sie dienen der Energiegewinnung des Corneaendothels und sie fungieren schließlich als Bausteine der Prostaglandinsynthese im Irisgewebe (Waitzman 1967).

Es ist seit langem bekannt, daß man beim Kaninchen durch Cholesterinfütterung eine dem Arcus senilis ähnliche Erscheinung auslösen kann. Cogan und Kuwabara (1956) wiesen jedoch darauf hin, daß viele Unterschiede bestehen.

2.3. Aminosäuren

Reddy (1961) verglich erstmals den Aminosäurengehalt von Plasma und Kammerwasser, indem er die jeweiligen Proben von 40 Albinokaninchen poolte. Außer Cystin, Glycin, Prolin und Threonin waren alle Aminosäuren im Kammerwasser höher konzentriert als im Plasma, woraus Reddy auf einen aktiven Transportmechanismus durch den Ciliarkörper schloß. Reddy (1970) fand weiterhin einen deutlichen Aminosäurenkonzentrationsgradienten vom Corneaepithel über das Hornhautstroma zum Kammerwasser - mit hohem Aminosäurengehalt im Epithel und niedrigerem in Stroma und Kammerwasser. Auch hier soll ein aktiver Transport vorliegen. Nach Laugenverätzung nehmen die AS-Konzentrationen in allen drei Kompartimenten significant ab (Welge-Lüssen). Ebenso kommt es nach Vereisung zu einem Abfall des AS-Gehaltes in Stroma und Kammerwasser (Wenske 1974). Postmortal verhalten sich die AS-Konzentrationen im Kammerwasser unterschiedlich, im Glaskörper dagegen kommt es zu eindeutigen Anstiegen der Konzentrationen (Stadler 1975).

Alle bisherigen Untersuchungen sprechen dafür, daß die Aminosäuren aktiv in das Kammerwasser sezerniert werden und von dort durch einen aktiven Prozeß im Hornhautstroma und besonders im Epithel angereichert werden. Dieser Mechanismus ist offenbar leicht durch verschiedene Noxen (Verätzung, Vereisung, etc.) zu beeinträchtigen. Da das Corneaepithel mit seinen hohen AS-Konzentrationen eine besondere Rolle zu spielen scheint, hielten wir es für

nützlich, den AS-Konzentrationsverlauf nach Epithelabrasio zu untersuchen.

3. Abrasio corneae

Durch die experimentelle Abrasio setzen wir einen totalen künstlichen Epitheldefekt. Epitheldefekte, die sich mit Hilfe der Fluoreszeinanfärbung sehr gut darstellen lassen, treten in der Praxis unter den verschiedensten pathologischen Bedingungen auf. Ätiologisch kommen in Frage:

Traumen, z.B. durch Zweige, conjunctivale Fremdkörper
UV-Licht, z.B. Höhensonne
Verätzungen, z.B. durch ungelöschten Kalk
Bakterien, z.B. beim Ulcus
Viren, z.B. beim Herpes corneae

Beim Herpes corneae wird sogar therapeutisch eine Abrasio durchgeführt. Neben der Möglichkeit der secundären Bakterienbesiedlung (Ulcus serpens) durch Verlust der epithelialen Schutzfunktion bieten Epitheldefekte sicher noch einige andere Besonderheiten. Auf Grund seiner Untersuchungen über Metabolitspiegel des Kohlenhydratstoffwechsels im Corneastroma und Kammerwasser nach Abrasio nannte Boeck (1971, siehe auch 2.1.) das Hornhautepithel eine "Diffusionsbarriere". Ein Epitheldefekt begünstigt somit den unkontrollierten Austausch von niedermolekularen Stoffen, wie z.B. Wasser (→ Corneaödem mit Trübung).

Da das Epithel also einerseits einen sehr intensiven Stoffwechsel besitzt, andererseits eine Barriere bildet, bietet sich als Modellversuch die Abrasio corneae an, um zu klären, welche der beiden Funktionen im Vordergrund steht.

4. Methodik

4.1. Versuchstiere und Operation

Unsere Versuchstiere waren 18 Kaninchen (Deutsche Widder) mit einem Gewicht zwischen 3.3 und 5.4 kg.
Zur Narkose erhielten die Tiere circa 35 mg/kg Pentobarbital i.v. (Nembutal^{R}). Die genaue Dosierung wurde individuell festgelegt. Zur Beurteilung der Narkosetiefe diente die Reaktion des Tieres auf einen Schmerzreiz (Ohrenkneifen). Auf eine zusätzliche Lokalanästhesie des Auges wurde verzichtet, um Artefakte durch eventuelle Auswirkungen auf die AS-Konzentrationen zu vermeiden. Mit einem Hockeymesser wurde das Hornhautepithel des rechten Auges unter Zuhilfenahme einer Zeiss-Lupenbrille vollständig abradiert. Unter der Spaltlampe wurde zusätzlich kontrolliert und eventuell letzte Epithelreste entfernt. Zur Vermeidung von Infektionen salbten wir das operierte Auge mit Polyspektran^{R}. Etwa eine Stunde nach Narkosebeginn erwachten die Tiere wieder und verhielten sich völlig unauffällig.

Die geschilderte Operation wurde alle 24 h bis zur Probengewinnung wiederholt, um vom Rand nachgewachsenes Epithel wieder vollständig zu entfernen. Der Zeitraum zwischen der ersten Abrasio und der Probengewinnung betrug bei der ersten Serie 24 h, bei der zweiten 48 h und bei der dritten 72 h . Die letzten 24 h vor der Probengewinnung wurden die Kaninchen einer Nahrungskarenz ausgesetzt, um große Schwankungen der AS-Konzentrationen durch ungleichmäßige Nahrungsaufnahme zu vermeiden.

4.2. Probengewinnung

Die Kaninchen wurden wie bei den vorausgegangenen

Operationen narkotisiert. Zunächst wurde am operierten rechten Auge nachgewachsenes Epithel restlos abradiert und verworfen, um eine Verunreinigung der Stromaprobe zu verhindern. Dann punktierten wir mit einer Tuberculinspritze (1-2 ml) und einer Kanüle Nr.18 die Vorderkammer und aspirierten das Kammerwasser möglichst vollständig. Anschließend wurde die Cornea mit einem Skalpell am Rand eingeschnitten, so daß man sie mit einer Hornhautschere von der Sklera trennen konnte. Das so erhaltene Hornhautstroma haben wir von Blut, eventuellen Randgefäßen und Endothel befreit, kurz mit destilliertem Wasser gereinigt und auf trockenes Filterpapier gelegt. Das gesunde linke Auge des Versuchstieres diente uns als Kontrolle. Dazu haben wir das intakte Epithel abradiert und aufgearbeitet (siehe unten). Wie bereits beschrieben haben wir auch links das Kammerwasser abpunktiert und das Hornhautstroma entnommen und gereinigt. Zum Schluß wurden dem Kaninchen 2 ml Blut entnommen, das sofort mit etwas Heparinpulver versetzt wurde, um eine Gerinnung auszuschließen.

4.3. Aufarbeitung der Proben

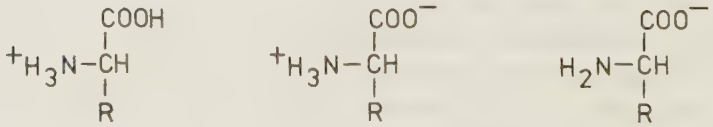
Zunächst wurden sämtliche Proben gewogen (Mettler Analysenwaage H 54). Das gesunde Epithel des linken Auges wurde sofort in 1 ml o.5 n Perchlorsäure homogenisiert (Potter) und enteiweißt. Das Hornhautstroma jeder Seite wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und für 24 h bei Zimmertemperatur lyophilisiert. Als Geräte wurden der Kryofix (WKF) und der Speedivac (Edward High Vacuum Ltd.) benutzt. Am nächsten Tag wurde das Stroma erneut gewogen (Trockengewicht) und anschließend mit einer Schere in 8 - 16 Teile zerkleinert. Diese haben wir dann in 1 ml o.5 n Perchlorsäure homogenisiert und enteiweißt. Das Kammerwasser links und rechts wurde direkt

in 1 ml o.5 n Perchlorsäure enteiweißt. Beim Blut wurden zunächst durch Zentrifugieren (5000 U/min , 10 min , Heraeus Christ Labofuge III) Zellen und Plasma voneinander getrennt. 1 ml des Plasmas wurde gewogen und in 1 ml o.5 n Perchlorsäure enteiweißt.

Bei allen Proben wurde nun das ausgefallene Eiweiß abzentrifugiert (5000 U/min , 10 min). Der Überstand wurde abgegossen und der Bodensatz in jeweils 1 ml o.5 n Perchlorsäure aufgewirbelt. Daraufhin wurde nochmals zentrifugiert und der erhaltene zweite Überstand zum ersten gegeben. Mit 10 n KOH wurde unter Kontrolle von Merck-Spezialindikator auf etwa pH 7 neutralisiert. Wegen des geringen Löslichkeitsproduktes von Kaliumperchlorat fällt dieses nahezu quantitativ aus und kann leicht abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde im Rotavapor (Büchi) bis zur Trockene eingeengt. Den Niederschlag lösten wir in 1 ml n/10 Salzsäure. Die nun fertige Probe haben wir bis zum Tag der Analyse im Tiefkühlfach bei -26°C aufbewahrt.

4.4. Analyse

Getrennt wurden die Aminosäuren durch die Ionenaustauschchromatographie. Je nach pH-Wert liegen die Aminosäuren als Kationen, Zwitterionen oder Anionen vor:



Bei Aminosäuren, die außer der obligatorischen α-Carboxylgruppe (Ausnahme Taurin, keine COOH-Gruppe) und der α-Aminogruppe noch weitere saure oder basische Gruppen

besitzen, gibt es dementsprechend noch mehr Möglichkeiten. Da der Übergang zwischen den einzelnen Formen für jede Aminosäure in einem spezifischen pH-Bereich liegt (pK-Werte), kann man dies für ihre Trennung ausnutzen.

Welge-Lüssen baute 1967 eine Apparatur zur AS-Trennung, die seitdem von mehreren Mitarbeitern weitgehend automatisiert wurde. Die Empfindlichkeit der Apparatur liegt unterhalb von 10^{-8} Mol AS , wobei die Fehlerbreite zwischen 1.6% (Alanin) und 5.9% (Valin) liegt.

Die sauren und neutralen Aminosäuren wurden in einer 160 cm langen Säule getrennt. Sie bestand aus einem Teflonschlauch von 2 mm Durchmesser, gefüllt mit Amberlite CG 12o . Die Korngröße dieses Harzes beträgt 35 - 45 μ . Durch einen Wassermantel wurde die Temperatur der Säule konstant auf 50°C gehalten. Zur Eluation dienten ein Puffer pH 3.25 in der ersten Phase (4.8 h) und ein Puffer pH 4.25 in der zweiten Phase (5.2 h). Innerhalb von zehn Stunden erschienen somit nacheinander im Eluat: Cyst.-ac, Tau, Asp, Glu, Cit, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu - Norleucin - Tyr, Phe . Anschließend wurde die Säule mit o.2 n NaOH 4.2 h regeneriert und 2.5 h mit Puffer pH 3.25 neutralisiert.

Zur Trennung der basischen Aminosäuren stand uns eine 60 cm lange Säule mit den gleichen Daten zur Verfügung. Hier flossen ein Puffer pH 4.20 bei einer Säulentemperatur von 25°C 4.2 h und ein Puffer pH 5.28 bei einer Temperatur von 50°C 9.8 h . Im Eluat erschienen Orn, Lys, His, Arg . Auch diese Säule wurde mit o.2 n NaOH 4.8 h regeneriert und mit Puffer pH 4.20 2.5 h neutralisiert.

Bei den verwendeten Puffern handelte es sich um Citratpuffer. Neben Citronensäure, Natriumhydroxyd und Salzsäure enthielten alle Phenol, um eine

Bakterienbesiedlung zu verhindern. Den Puffern pH 3.25 und 4.25 wurde außerdem Thiodiäthanol zugesetzt, das eine Oxidation von Methionin vermeiden sollte. Allen Lösungen wurde BRIJ zugesetzt, um die Oberflächenspannung zu vermindern. Sämtliche Puffer, die o.2 n NaOH und die Ninhydrinlösung (siehe unten) wurden von Labotron-Präzisionspumpen mit einer konstanten Geschwindigkeit von 3 ml/h (beim Ninhydrin 1.5 ml/h) befördert. Dadurch entstand vor der großen Säule ein Druck von 4 - 5 atü . Das Eluat aus jeder Säule wurde in einem Mischblock im Verhältnis 2:1 mit Ninhydrin gemischt und anschließend 20 min im Wasserbad auf 100 C erhitzt (Die Schlauchlänge im Wasserbad war so berechnet, daß sich eine Durchflußzeit von 20 min ergab). Die Extinktion des je nach AS-Gehalt verfärbten Gemisches wurde in einem Beckman Photometer DB bei 578 nm gemessen und fortlaufend mit einem Beckman Laborschreiber registriert.

Zur Auswertung wurden beide Säulen zunächst mit einem Beckman Aminosäurentestgemisch bekannter Konzentration geeicht. Die Flächeninhalte der einzelnen AS-peaks wurden dabei als Maß für die Molmenge angesehen. Unter Berücksichtigung des zur Analyse verwendeten Teils und des Gewichtes der Probe wurde die Probenkonzentration in 10^{-8} Mol/g berechnet. Bei Stromapräparaten wurde wegen des hohen Anteils an Trockengewicht auf den Wassergehalt umgerechnet, um die Werte der einzelnen Augenkompartimente miteinander vergleichen zu können. Da wir bei der Färbeaktivität des Ninhydrins Schwankungen fanden, gaben wir zu Eichlösung und Proben je 2 x 10^{-8} Mol Norleucin. Diese Aminosäure diente uns als Standard des Färbeindex. Sie ergab einen circa 4.5 cm hohen peak. Die Schwankungen erklären sich aus einem Aktivitätsverlust des Ninhydrins - trotz Lagerung im Kühlschrank und vierzehntägiger Erneuerung. Außerdem hängt die Aktivität von konstanten Herstellungsbedingungen der Lösung ab.

Insgesamt ergibt sich für die Berechnung folgende Formel:

$$C_{AS} = \frac{A}{A_o} \times \frac{1}{p} \times \frac{h_o}{h} \times \frac{1}{m\,(-m')^{*}} \times n_o$$

*Der Klammerausdruck gilt nur für Stromaproben, bei allen anderen entfällt er.

Es bedeuten im einzelnen:

C_{AS} Konzentration einer bestimmten AS in einer Probe in Mol/g

A Fläche des AS-peaks in der Analyse in cm^2

A_o Fläche des AS-peaks in der Eichkurve in cm^2

p zur Analyse benutzter Probenanteil

h_o Höhe des Norleucinpeaks in der Eichkurve in cm

h Höhe des Norleucinpeaks in der Analyse in cm

m Masse der Probe in g

m' Trockenmasse der (Stroma-) Probe nach Lyophilisieren in g

n_o für die Eichkurve benutzte Menge der AS in Mol

4.5. Statistische Berechnung

Bei medizinischen Untersuchungen wird eine Differenz zwischen zwei Mittelwerten im allgemeinen dann als statistisch significant angesehen, wenn die Wahrscheinlichkeit, daß sie auf Zufall beruht, kleiner als 5% ist. Deshalb war es unsere Aufgabe, diese Zufallswahrscheinlichkeit für gefundene Unterschiede zwischen normalen und pathologischen Werten zu berechnen.

Zunächst wurde der Mittelwert für Werte der gleichen Serie gebildet:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{r=1}^{n} x_r}{n}$$

Die Standardabweichung errechneten wir nach folgender Formel:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{r=1}^{n} (x_r - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Weiter ergab sich die Standardabweichung des Mittelwertes:

$$s_M = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Um die Zufallswahrscheinlichkeit zu bestimmen, führten wir den t-Test durch:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_{M1}^2}{n_1} + \frac{s_{M2}^2}{n_2}}}$$

Unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades df

$$df = n_1 + n_2 - 2$$

wurde zu dem erhaltenen t-Wert die zugehörige Wahrscheinlichkeit p aufgesucht (Student-Verteilung in Wissenschaftliche Tabellen, Fa. Geigy, Basel 1960 , 6. Auflage, S. 32). Je kleiner p ist, desto sicherer ist der Unterschied. Wenn $p < 0.05$ (5%), gilt die Differenz als "significant".

5. Ergebnisse

5.1. Klinik

In 24 h nach Epithelabrasio bzw. Reabrasio ist vom Rand ein circa 2 mm breiter Epithelring nachgewachsen. Diese Zellschicht ist sehr locker und läßt sich viel leichter von ihrer Unterlage, dem Hornhautstroma, lösen als die komplette Epitheldecke des gesunden Kontrollauges. Das intakte Epithel der unbehandelten Seite hat ein Gewicht von 4.1 - 7.1 mg . Die Hornhaut des abradierten Auges ist nur schwach getrübt, aber deutlich ödematös geschwollen. Die Vorderkammer hat im Vergleich zur gesunden Seite eine normale Tiefe. Die Gewichte der Proben bestätigen diese klinischen Befunde. Während sich die Kammerwassermenge des abradierten Auges mit o.194 - o.320 g in demselben Bereich bewegt wie die des gesunden mit o.186 - o.378 g , sind die behandelten Hornhäute mit 100 - 152 mg merklich schwerer als die gesunden mit 59 - 109 mg (etwa 1.5fach). Der Wassergehalt des Corneastromas verdeutlicht den Unterschied:

normal	75.88 $\pm$ o.37 % H_2O
24 h nach Abrasio	84.86 $\pm$ o.28 % H_2O
48 h nach Abrasio	84.20 $\pm$ o.27 % H_2O
72 h nach Abrasio	83.97 $\pm$ o.63 % H_2O

Am ersten Tag nach der primären Abrasio kommt es zu einer starken Zunahme der Hydratation ($p < o.ooo5$), am zweiten Tag zu einer leichten, aber significanten Abnahme ($p < o.oo25$), während sich nach dem dritten Tag kein statistisch gesicherter Unterschied zum Vortag zeigt.

5.2. Aminosäuren

5.2.1. Normalwerte

Die Normalwerte der Aminosäurekonzentrationen wurden in Epithel, Hornhautstroma und Kammerwasser der gesunden Kontrollaugen sowie im Plasma von 18 Kaninchen bestimmt. Es zeigt sich ein Konzentrationsabfall vom Epithel über Stroma und Kammerwasser zum Plasma. Abweichend hiervon ist Glycin im Kammerwasser deutlich niedriger konzentriert als im Plasma. Bei Citrullin ist die Plasmakonzentration etwas höher als die in Kammerwasser und Stroma. Die Werte von Alanin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin und Arginin liegen im Kammerwasser entgegen der Regel etwas höher als im Stroma.

5.2.1.1. Epithel

Die Aminosäure mit der höchsten Konzentration im Epithel ist das Taurin mit 1552 x 10^{-8} Mol/g . Besonders hoch konzentriert sind weiterhin Cysteinsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin, Methionin und Lysin mit 70 - 220 x 10^{-8} Mol/g . Relativ niedrige Werte zwischen 12 und 51 x 10^{-8} Mol/g haben Citrullin, Cystin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin, Histidin und Arginin.

5.2.1.2. Stroma

Wie im Epithel ist auch im Stroma Taurin mit 209 x 10^{-8} Mol/g besonders hoch konzentriert. Relativ hohe Werte von 35 - 71 x 10^{-8} Mol/g haben Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Valin und Lysin. Kleine Konzentrationen zwischen 6 und 21 x 10^{-8} Mol/g haben Cysteinsäure, Asparaginsäure,

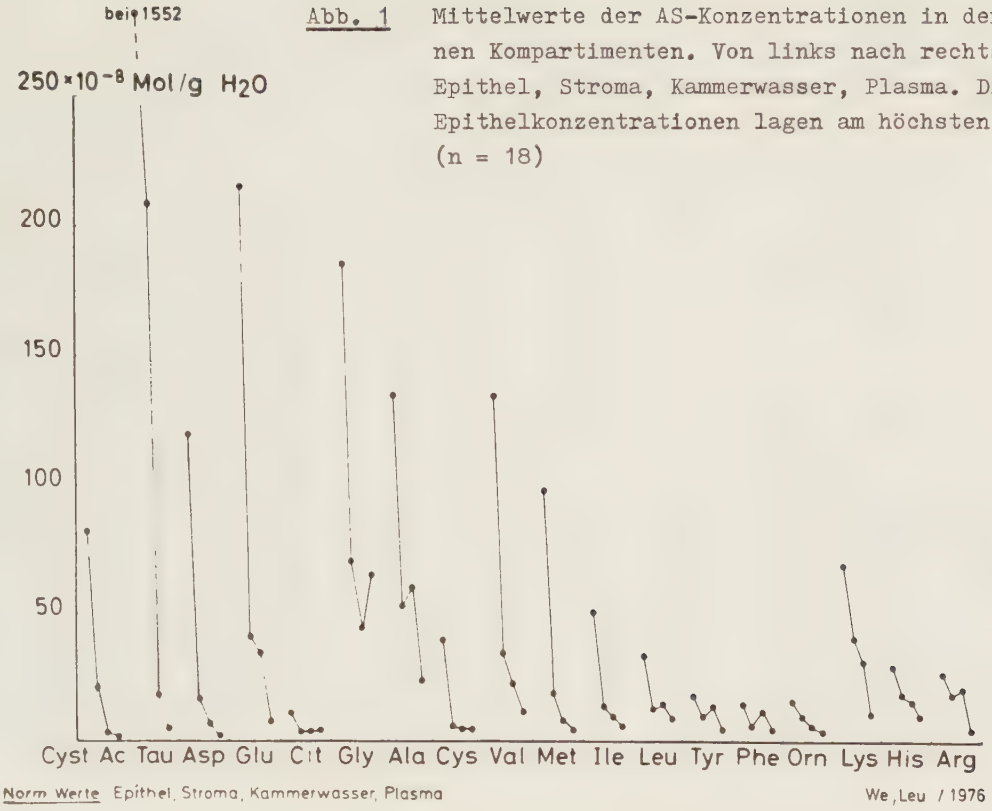


Abb. 1 Mittelwerte der AS-Konzentrationen in den einzelnen Kompartimenten. Von links nach rechts: Epithel, Stroma, Kammerwasser, Plasma. Die Epithelkonzentrationen lagen am höchsten. (n = 18)

Citrullin, Cystin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin, Histidin und Arginin.

5.2.1.3. Kammerwasser

Kammerwasser enthält relativ viel (33 - 61 x 10^{-8} Mol/g) Glutaminsäure, Glycin, Alanin und Lysin. Niedrig konzentriert sind mit Werten von 3 - 23 x 10^{-8} Mol/g Cysteinsäure, Taurin, Asparaginsäure, Citrullin, Cystin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin, Histidin und Arginin.

5.2.1.4. Plasma

Herausragende Plasmakonzentrationen haben Glycin mit 66 sowie Alanin mit 24 x 10^{-8} Mol/g . Relativ hoch liegen mit 8.5 - 12.3 x 10^{-8} Mol/g noch Glutaminsäure, Valin, Leucin, Lysin und Histidin. Kleine Werte zwischen 1.6 und 5.9 x 10^{-8} Mol/g haben Cysteinsäure, Taurin, Asparaginsäure, Citrullin, Cystin, Methionin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin und Arginin.

5.2.2. AS-Konzentrationen nach Abrasio

Die Konzentrationen von 18 Aminosäuren wurden in Hornhautstroma und Kammerwasser 24 h , 48 h und 72 h nach Abrasio an jeweils sechs Kaninchen beobachtet. Sämtliche Aminosäuren sind nach Abrasio statistisch significant erniedrigt - in Stroma und Kammerwasser. Sie unterscheiden sich jedoch in Beginn und Steilheit des Abfalles. Während viele Aminosäuren während des dreitägigen Beobachtungszeitraumes bereits wieder ansteigen, bleiben einige auf tiefem Niveau stehen und

andere zeigen auch nach 72 h noch fallende Tendenz.

5.2.2.1. Stroma nach Abrasio

Im Stroma fallen nach 24 h alle Aminosäuren außer Glycin significant ab - Glycin folgt nach 48 h . Ein Minimum erreichen nach 24 h Glutaminsäure, Alanin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin und Arginin, nach 48 h Cysteinsäure, Asparaginsäure, Citrullin, Glycin, Cystin, Isoleucin und Ornithin, um dann wieder anzusteigen, ohne jedoch die Ausgangslage zu erreichen. Taurin und Histidin pendeln sich auf tiefem Niveau ein, während Valin, Methionin und Lysin ständig weiter fallen. Die tiefste auftretende Konzentration liegt bei Taurin mit 20% des Normalwertes am niedrigsten, bei Glutaminsäure mit 69% am höchsten. Die übrigen Aminosäuren haben tiefste Werte zwischen 30 und 54% der normalen Ausgangslage.

5.2.2.2. Kammerwasser nach Abrasio

Auch im Kammerwasser erniedrigen sich nach Abrasio sämtliche AS-Konzentrationen - allerdings nicht zum gleichen Zeitpunkt. Ein significanter Abfall beginnt am ersten Tag bei Taurin, Glutaminsäure, Alanin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin, Lysin und Histidin. Am zweiten Tag sinken Citrullin, Glycin, Cystin und Arginin, am dritten Tag folgen Cysteinsäure, Asparaginsäure und Valin. Ein Minimum erreichen nach 24 h Alanin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin und Lysin, nach 48 h Citrullin, Glycin, Cystin und Methionin. Cysteinsäure und Glutaminsäure erreichen nach 48 h ein Maximum, das über ihrem Normalwert liegt, um dann steil abzufallen. Leucin bleibt auf tiefem Niveau stehen. Auch am dritten Tag fallen noch Taurin,

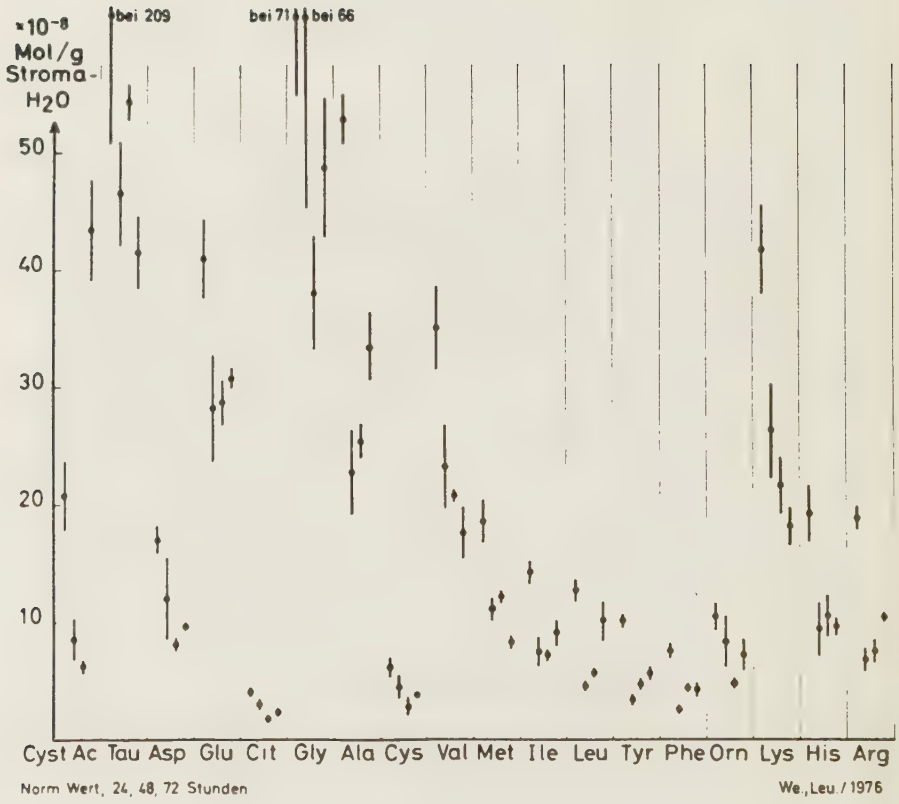


Abb. 2 Mittelwerte M und Standardabweichungen der Mittelwerte S_M der freien Aminosäuren im Stroma. 1. Wert: Normalwert (n = 17), die folgenden Werte entsprechen den Konzentrationen 24 h , 48 h und 72 h nach täglicher Abrasio (n = 6).

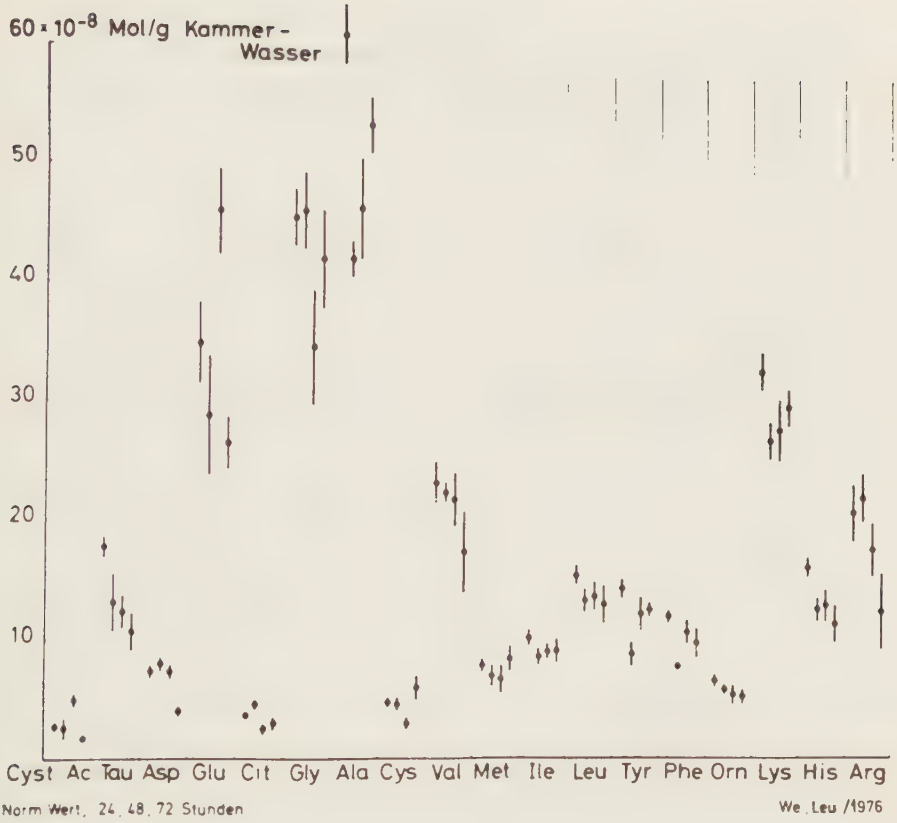


Abb. 3 Mittelwerte M und Standardabweichungen der Mittelwerte S_M der freien Aminosäuren im Kammerwasser. 1. Wert: Normalwert (n = 18), die folgenden Werte entsprechen den Konzentrationen 24 h , 48 h und 72 h nach täglicher Abrasio (n = 6).

Asparaginsäure, Valin, Ornithin, Histidin und Arginin weiter ab. Die tiefsten auftretenden Konzentrationen liegen im Kammerwasser zwischen 56 und 85% der Normalwerte.

5.2.2.3. Vergleich der beiden Kompartimente

Bei den Aminosäuren mit einem normalen Stroma/Kammerwasser-Quotienten unter 1.0 liegen auch alle pathologischen Quotienten unter 1.0 (Alanin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin und Arginin). Bei einigen Aminosäuren mit einem Ausgangsquotienten über 1.0 sinkt dieser Quotient nach Abrasio zeitweise unter 1.0 - d.h. der normale Konzentrationsgradient (Stroma > Kammerwasser) wird umgekehrt (Glutaminsäure, Citrullin, Cystin, Valin, Isoleucin, Ornithin, Lysin und Histidin).

6. Diskussion

6.1. Klinik

Das Hornhautepithel von Kaninchenaugen wurde täglich restlos entfernt. Nach 24 h war es um 1 - 2 mm vom Rand her nachgewachsen. Nach Duke-Elder (1965) dauert die vollständige Reepithelisierung beim Kaninchen sieben Tage, Wenske (1974) fand hierfür eine Zeit von neun bis zwölf Tagen.

Der Wassergehalt des normalen Corneastromas beträgt bei uns 76% und stimmt mit den von Turss et al. (1974) und Welge-Lüssen und Gerstner (1975) gefundenen Werten (76% bzw. 75%) überein. Nach Abrasio steigt der Wassergehalt auf etwa 84% an, was einer Massenzunahme des

Stromas um etwa 50% entspricht. Welge-Lüssen und Gerstner (1975) fanden nach 60 sec Laugenverätzung einen Wassergehalt von 81 - 89% , Turss und Mitarbeiter (1974) fanden nach 90 sec Laugenverätzung einen entsprechenden Wert von 82% . Das Ausmaß des Corneaödems ist möglicherweise nach Epitheldefekten verschiedener Genese gleich groß. Da der Wassergehalt bei unseren drei Untersuchungszeiten (24 h , 48 h , 72 h nach Abrasio) in etwa gleich ist, schließen wir daraus, daß das Ödem bereits nach 24 h voll ausgebildet ist und sich auch nicht mehr zurückbildet, solange der Epitheldefekt bestehen bleibt. Das intakte Corneaepithel ist offensichtlich für einen normalen Quellungszustand der Hornhaut unerläßlich.

6.2. Aminosäuren

Bei unseren Versuchen wurden 18 Aminosäuren bestimmt: Cysteinsäure, Taurin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Citrullin, Glycin, Alanin, Cystin, Valin, Methionin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin, Ornithin, Lysin, Histidin und Arginin. Prolin wurde aus technischen Gründen nicht mitbestimmt, da nur bei einer Wellenlänge gemessen werden konnte (578 nm). Auf eine Auswertung der Aminosäuren Threonin und Serin wurde verzichtet, da eine saubere Trennung der beiden nur selten möglich war. Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Gewebemengen war eine zusätzliche saure Hydrolyse - mit dem Ziel einer besseren Isolierung von Threonin und Serin - nicht möglich.

6.2.1. Normalwerte

Unsere Werte für das gesunde Hornhautepithel liegen insgesamt etwas niedriger als die von Welge-Lüssen und Gerstner (1975) gefundenen Konzentrationen. Auffallende

Unterschiede bieten lediglich Valin, das bei uns dreimal so hoch liegt, sowie Ornithin und Lysin, die bei uns 20mal bzw. viermal niedriger konzentriert sind. Die beiden letztgenannten Aminosäuren, die zu den basischen gerechnet werden, sind gelegentlich durch hohe NH_3-peaks schwer zu identifizieren, so daß Meßfehler entstehen können. Im Vergleich zu den Werten von Reddy (1970) liegen unsere teils höher (Ile 5x , Orn 4x , Val 4.5x , Lys 3x , Met 15x , Arg 1.8x , Asp 1.5x , His 1.4x , Leu 1.3x , Gly 1.1x) teils niedriger (Tau o.8x , Glu o.8x , Ala o.5x , Tyr o.5x , Phe o.4x). Für die Messung richtiger und genauer AS-Konzentrationen ist nicht nur eine exakte AS-Analyse notwendig, sondern auch eine präzise Wägung der entnommenen Proben. Während beim Hornhautstroma, Kammerwasser und Plasma wegen der relativ großen Substanzmengen Meßfehler vernachlässigbar klein sind, ist eine exakte Wägung des Corneaepithels, dessen Mengen im Milligrammbereich liegen, schwer durchzuführen. Die größte Fehlerquelle ist die Gewichtsabnahme durch Verdunstung von Wasser. Um den Meßfehler möglichst gering zu halten, haben wir rasch abradiert und gleichzeitig ein Reagenzglas mit o.5 n Perchlorsäure gewogen. Das Epithel wurde schnell in das Röhrchen eingegeben und anschließend unverzüglich nochmals gewogen, so daß die Gewichtsdifferenz dem Epithelgewicht entsprach.

Die von uns ermittelten Stroma-AS-Konzentrationen stimmen im wesentlichen mit den Werten von Reddy (1970) und Welge-Lüssen und Gerstner (1975) überein. Auffallend ist bei Reddy ein sehr kleiner Wert für Methionin, wie im Epithel. Methionin ist eine Aminosäure, die sehr leicht oxydiert. Aus diesem Grund enthalten unsere zur Chromatographie benutzten Puffer Thiodiglykol als antioxydative Substanz.

Im Kammerwasser liegen unsere AS-Konzentrationen in demselben Bereich wie die Werte von Reddy (1961 , 1970),

Oppermann (1970), Mössinger (1970), Domeier (1973), Gerstner (1974) und Wenske (1974). Die Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Autoren ist recht gut. Reddy fand allerdings auch im Kammerwasser deutlich kleinere Methioninkonzentrationen als andere Untersucher.

Die Plasma-AS-Konzentrationen wurden in unserer Arbeitsgruppe erstmals zusätzlich gemessen, da uns der Vergleich der Konzentrationen in den einzelnen Kompartimenten unter klinischen Aspekten wichtig schien. Die von Reddy (1961) ermittelten Plasma-AS-Konzentrationen liegen etwa doppelt so hoch wie unsere Werte. Lediglich Methionin ist bei uns viermal höher konzentriert. Unsere Versuchstiere wurden exakt einer 24 h - Nahrungskarenz ausgesetzt. Die Streubreiten der Plasma-AS-Konzentrationen liegen bei 5 - 10% und sind damit im biologischen Bereich.

Beim Vergleich der Kompartimente untereinander zeigt sich ein Konzentrationsabfall vom Epithel über Stroma und Kammerwasser zum Plasma, wie ihn bereits Reddy (1961 , 1970) und Welge-Lüssen und Gerstner (1975) gefunden haben. Bei Glycin ist allerdings die Plasmakonzentration höher als die im Kammerwasser - wie schon bei Reddy. Der beschriebene Konzentrationsgradient spricht gegen eine passive Diffusion von Aminosäuren aus dem Plasma in Kammerwasser, Stroma und Epithel. Die hohen Konzentrationen lassen sich durch einen aktiven Transport (Reddy 1970) oder durch eine Biosynthese von Aminosäuren im Epithel erklären. Letztere ist aber unwahrscheinlich, da auch die "essentiellen" Aminosäuren den beschriebenen Konzentrationsgradienten zeigen.

6.2.2. AS-Konzentrationen nach Abrasio

Nach Abrasio sinken die Konzentrationen aller von uns

bestimmten Aminosäuren in Hornhautstroma und Kammerwasser.

Taurin nimmt eine Sonderstellung ein. Während es sich im Plasma und im gesunden Kammerwasser im Konzentrationsbereich der anderen Aminosäuren befindet, ist es im gesunden Hornhautstroma und Epithel die bei weitem höchst konzentrierte Aminosäure. Das Verhältnis der Konzentrationen Epithel/Stroma/Kammerwasser/Plasma beträgt am gesunden Kaninchen 316/43/3.7/1 . Daraus läßt sich auf einen sehr leistungsfähigen aktiven Anreicherungsprozeß schließen, der durch Ausfall des Epithels offenbar empfindlich gestört wird. 24 h nach Abrasio sind die Konzentrationen von Taurin in Stroma und Kammerwasser auf 22% bzw. 74% der Normalwerte abgesunken. Das Konzentrationsverhältnis Stroma/Kammerwasser/Plasma beträgt jetzt nur noch 9.5/2.7/1 . Da Taurin das Decarboxylierungsprodukt von Cysteinsäure ist, ist es nicht wie die anderen eine α-Aminocarbonsäure. Taurin besitzt keine COOH-Gruppe.

Von den übrigen schwefelhaltigen Aminosäuren verhalten sich Cystin und Methionin qualitativ wie Taurin. Der Konzentrationsabfall ist aber weniger ausgeprägt und setzt - vor allem bei Cystin - langsamer ein. Cysteinsäure fällt im Stroma ebenfalls deutlich ab, erreicht nach 48 h ein Minimum und steigt am dritten Tag auf das Doppelte des Normalwertes an. Im Kammerwasser bleibt Cysteinsäure zunächst 24 h konstant, steigt dann fast auf das Doppelte an, um nach dem dritten Tag steil auf 67% des Normalwertes zu fallen.

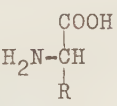
Von den Dicarbonsäuren fällt Asparaginsäure im Stroma bereits am ersten Tag merklich ab, während sie im Kammerwasser über zwei Tage nahezu konstant bleibt und erst am dritten Tag deutlich sinkt. Glutaminsäure sinkt im Stroma ebenfalls schon am ersten Tag, ebenso im Kammerwasser. Die Glutaminsäurekonzentration des Kammerwassers steigt

am zweiten Tag über den Normalwert an, um am dritten Tag wieder zu fallen. Dieses Zwischenmaximum bleibt ungeklärt, beruht aber kaum auf einem Meßfehler, da die Standardabweichung dieses Wertes relativ gering ist.

Aminosäuren mit mindestens zwei Aminogruppen sind Citrullin, Ornithin, Lysin, Histidin und Arginin. Im Stroma sinken alle bereits am ersten Tag. Im Kammerwasser fallen nur Ornithin, Lysin und Histidin schon in den ersten 24 h , während Arginin erst am zweiten Tag fällt. Citrullin steigt am ersten Tag zunächst an und fällt dann am zweiten.

Die beiden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin, die sich nur durch die OH-Gruppe des Tyrosins in para-Stellung am Benzolring unterscheiden, verhalten sich völlig gleich. Dies kann durch die leichte Umwandelbarkeit ineinander durch das Enzym Phenylalaninhydroxylase erklärt werden. Beide Aminosäuren fallen in Stroma und Kammerwasser schon in den ersten 24 h deutlich ab. Das Konzentrationsverhältnis von Tyrosin zu Phenylalanin beträgt bei den Normalwerten und zu jedem Zeitpunkt nach Abrasio in allen Kompartimenten etwa 1.2 : 1 . Nur die Plasmakonzentration des Tyrosins liegt etwas unter der des Phenylalanins (Verhältnis o.95 : 1).

Die Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin haben alle einen neutralen, unpolaren, nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff bestehenden Rest R und verhalten sich deshalb chemisch recht ähnlich. Im Stroma sinken sie alle außer Glycin am ersten Tag significant. Wahrscheinlich sinkt auch Glycin, aber durch die extrem hohe Standardabweichung des 24 h - Wertes (24% des Mittelwertes) ist eine Significanz nicht gegeben. Am zweiten Tag ist der



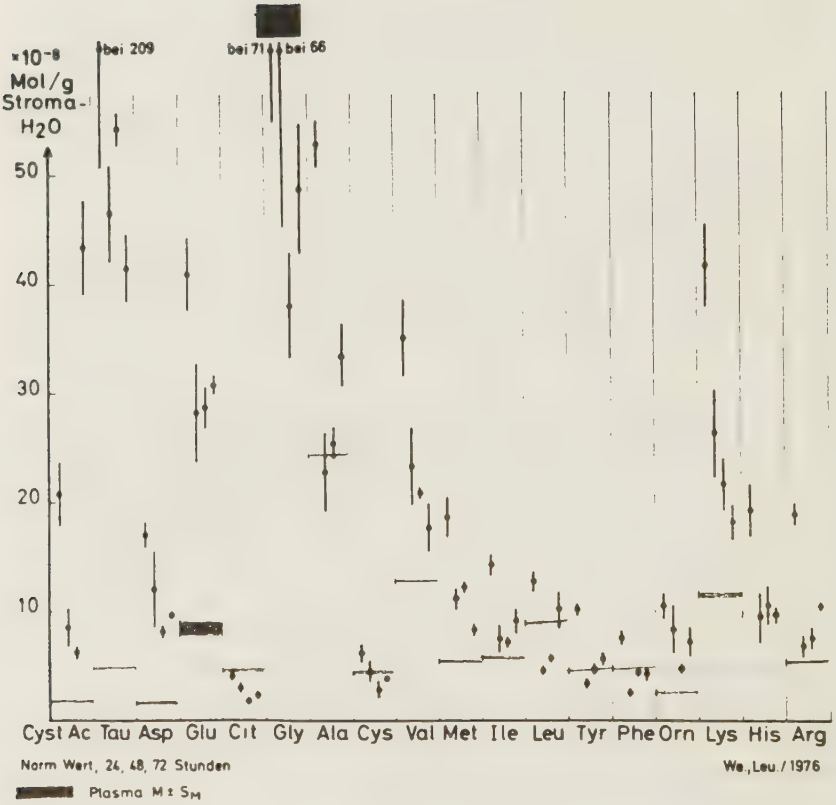


Abb. 4 Mittelwerte M und Standardabweichungen der Mittelwerte S_M der freien Aminosäuren im Stroma. 1. Wert: Normalwert (n = 17), die folgenden Werte entsprechen den Konzentrationen 24 h , 48 h und 72 h nach täglicher Abrasio (n = 6). Die dunklen Querbanden stellen $M \pm S_M$ der AS-Konzentrationen im Plasma dar.

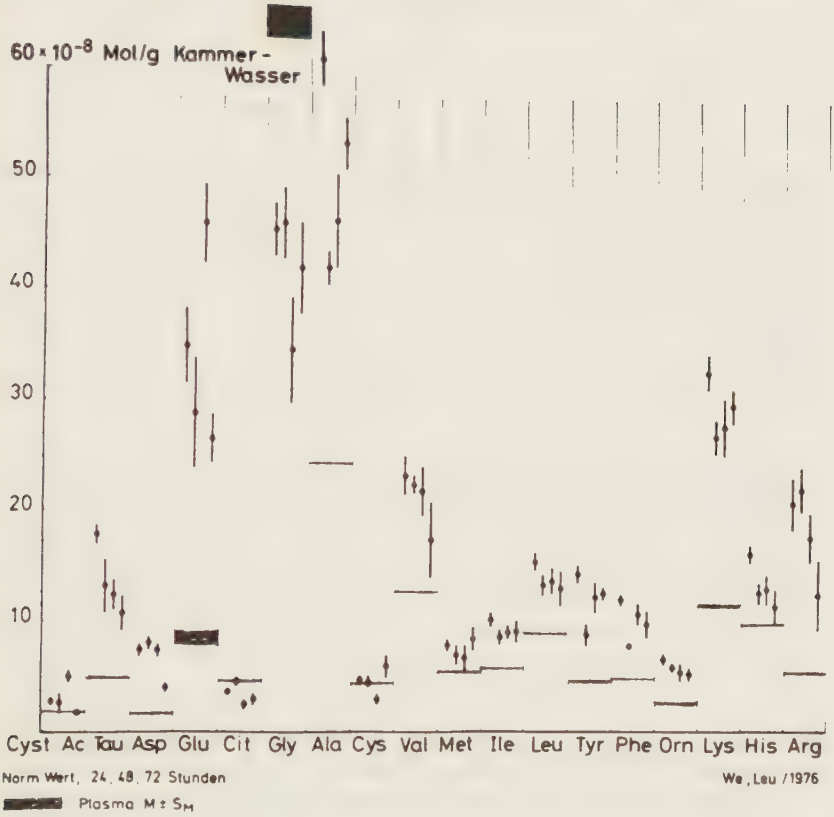


Abb. 5 Mittelwerte M und Standardabweichungen der Mittelwerte S_M der freien Aminosäuren im Kammerwasser. 1. Wert: Normalwert (n = 18), die folgenden Werte entsprechen den Konzentrationen 24 h , 48 h und 72 h nach täglicher Abrasio (n = 6). Die dunklen Querbanden stellen $M \pm S_M$ der AS-Konzentrationen im Plasma dar.

Abfall der Glycinkonzentration jedoch significant. Im Kammerwasser fallen nur Alanin, Isoleucin und Leucin am ersten Tag, Glycin folgt am zweiten, Valin erst am dritten Tag.

Vergleicht man die pathologischen Konzentrationen in Stroma und Kammerwasser mit den zugehörigen Plasmawerten (Abb. 4 und 5), so findet man folgendes: Im Stroma fallen Alanin und Histidin auf ihr Plasmaniveau ab, während Glycin, Cystin, Leucin, Tyrosin und Phenylalanin sogar unter ihre Plasmakonzentrationen sinken. Bei Citrullin liegt bereits der Stroma-Normalwert unter dem Plasmawert. Im Kammerwasser fällt Cysteinsäure auf ihr Plasmaniveau ab, Cystin sinkt darunter. Bei Citrullin und Glycin liegen sowohl Normalwerte als auch pathologische Konzentrationen unterhalb des jeweiligen Plasmaniveaus. Der normale Konzentrationsgradient zwischen Stroma und Kammerwasser wird bei Citrullin, Cystin, Isoleucin, Ornithin, Lysin und Histidin nach Abrasio zeitweilig umgekehrt.

Theoretisch kann der Konzentrationsabfall sämtlicher Aminosäuren auf zwei Arten erklärt werden:

1. Das Epithel ist Syntheseort für Aminosäuren, die in das Stroma und Kammerwasser diffundieren. Nach Fortfall des Epithels sinken deshalb die Konzentrationen in Stroma und Kammerwasser.
2. Das Epithel ist eine "Diffusionsbarriere" (Boeck, 1971), die den unkontrollierten Austausch niedermolekularer Stoffe (z.B. Aminosäuren) zwischen Stroma und Tränenflüssigkeit hemmt. Nach Fortfall dieser Schranke fließen Aminosäuren vom Ort hoher Konzentration (Stroma) zum Ort niedriger Konzentration (Tränenfilm) ungehindert ab. Dadurch sinken die Stroma-AS-Konzentrationen. Durch eine kompensatorische Aktivierung des aktiven AS-Transportes

vom Kammerwasser in das Stroma verarmt auch das Kammerwasser an Aminosäuren.

Gegen die Theorie einer Biosynthese von Aminosäuren im Epithel spricht das Verhalten der essentiellen Aminosäuren. Auch sie sind im Epithel des gesunden Auges sehr viel höher konzentriert als im Stroma, Kammerwasser und Plasma. Auch ihre Konzentrationen fallen in Stroma und Kammerwasser nach Abrasio. Damit müßten aber auch die essentiellen Aminosäuren im Epithel synthetisiert werden können. Bis heute ist man jedoch der Meinung, daß die essentiellen Aminosäuren für alle Gewebe wirklich essentiell sind, d.h. von außen zugeführt werden müssen.

Auf der anderen Seite spricht die zeitweilige Umkehrung des normalen Stroma/Kammerwasser-Konzentrationsgradienten einiger Aminosäuren für einen Abfluß aus dem Stroma in die Tränenflüssigkeit. Messungen in diesem Medium sind von uns nicht durchgeführt worden. Reim, Cattepoel, Bittmann und Kilp (1969) zeigten, daß nach Abrasio und Spülen der freien Hornhautoberfläche mit physiologischer Kochsalzlösung die (auch) extrazellulären Metabolite Glucose, Lactat und Pyruvat significant vermindert waren. In der Spülflüssigkeit befanden sich dementsprechend erhebliche Mengen Glucose, vor Abrasio dagegen nur wenig. Boeck (1971) sprach nach seinen Untersuchungen (KH-Metabolitbestimmungen nach Abrasio, siehe 2.1.) von einem Abfließen von Lactat, Pyruvat und Glucose in den Tränenfilm nach Abrasio. Nimmt man allgemein einen ungehinderten Austausch niedermolekularer Stoffe zwischen Stroma und Tränenfilm nach Abrasio an, so strömen Metabolite des Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsels aus dem Stroma in den Tränenfilm, während Wasser, das in der Tränenflüssigkeit höher konzentriert ist, in das Hornhautstroma eindringt und hier ein Ödem verursacht. Auch der zeitlich unterschiedliche Beginn des Konzentrationsabfalles in Stroma und Kammerwasser läßt sich mit dieser

Theorie erklären. Während unmittelbar nach Abrasio Aminosäuren aus dem Stroma abfließen und Wasser einströmt, setzt die kompensatorische Aktivierung des AS-Transportes vom Kammerwasser in das Stroma erst später ein, wenn niedrige Stromakonzentrationen erreicht sind. Dadurch fallen bereits in den ersten 24 h im Stroma alle AS-Konzentrationen und das Corneaödem ist vollständig ausgebildet, wie die Analyse des Wassergehaltes zeigt. Im Kammerwasser setzt der Konzentrationsabfall dagegen bei mehreren Aminosäuren erst langsamer, am zweiten oder dritten Tag ein.

Um die Theorie der "Diffusionsbarriere Epithel" zu widerlegen oder zu erhärten, wären weitere Untersuchungen wünschenswert. Es wäre interessant zu wissen, wie sich andere niedermolekulare Substanzen, z.B. Elektrolyte, nach Abrasio verhalten. Auch AS-Konzentrationsmessungen in der Tränenflüssigkeit wären nützlich. Wegen des geringen AS-Gehaltes und der Notwendigkeit einer streng konstanten Tränensekretion sind solche Bestimmungen jedoch schwer durchzuführen. Schließlich könnte man einen künstlichen Epitheldefekt mit einer künstlichen Membran, wie sie Turss und Schebitz (1971) bei anderen Untersuchungen benutzten, decken und sehen, ob sich so der Abfluß von Substanzen verhindern läßt.

7. Zusammenfassung

Nach kurzer Darstellung von Anatomie und Biochemie der vorderen Augenabschnitte wird auf Vorkommen und Bedeutung von Hornhautepitheldefekten in der klinischen Ophthalmologie hingewiesen.
Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer täglichen Abrasio corneae im Verlauf von drei Tagen auf die Aminosäurekonzentrationen in Hornhautstroma und Kammerwasser festzustellen, um Erkenntnisse über die Bedeutung des intakten Corneaepithels zu gewinnen.
Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte durch Eluationschromatographie.
24 h nach Abrasio steigt der Wassergehalt des Hornhautstromas von 76% (Normalwert) auf 84% an und ändert sich nach 48 h und 72 h nur unwesentlich.
Im Stroma sinken 24 h nach Abrasio alle 18 von uns bestimmten Aminosäuren. Zwölf steigen in den folgenden 48 h wieder an, drei bleiben auf etwa gleichem Niveau stehen, drei fallen ständig weiter ab. Am Ende der dreitägigen Versuchsdauer sind 17 Aminosäuren noch deutlich erniedrigt.
Im Kammerwasser sinken 24 h nach Abrasio nur elf Aminosäuren. Nach 48 h sinken weitere fünf Aminosäuren, nach 72 h fallen die verbleibenden zwei. Sechs Aminosäuren steigen während der Untersuchungszeit wieder an, fünf bleiben auf niedrigem Niveau, sieben zeigen auch nach 72 h noch fallende Tendenz. Am Ende der dreitägigen Versuchsdauer sind noch 16 Aminosäuren deutlich erniedrigt.
Unsere Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen des Kohlenhydratstoffwechsels nach Abrasio überein. Das gesunde Hornhautepithel stellt unserer Meinung nach eine Diffusionsbarriere dar, nach deren Abrasio es wahrscheinlich zu einem Abfluß von Aminosäuren aus dem Stroma in die Tränenflüssigkeit kommt. Messungen in

diesem Medium stehen noch aus. Durch die Annahme, daß die Aminosäurenverluste im Stroma Kompensationsmechanismen induzieren, kann die Konzentrationsverminderung im Kammerwasser erklärt werden.

8. Methodischer Anhang

8.1. Tabellen

8.2. Geräte

8.3. Chemikalien

Tab. I Mittelwerte M und Standardabweichungen der Mittelwerte S_M der freien Aminosäuren im Epithel und Plasma in 10^{-8} Mol/g .

	EPITHEL			PLASMA		
	M	S_M	n	M	S_M	n
Cys.ac.	82.32	5.46	12	1.81	o.10	15
Tau	1552.44	76.64	12	4.91	o.40	17
Asp	120.18	7.55	12	1.63	o.14	16
Glu	216.58	15.12	12	8.52	1.60	17
Cit	11.75	1.63	12	4.67	o.26	17
Gly	186.99	20.17	12	65.78	3.14	17
Ala	136.03	9.07	12	24.20	1.41	17
Cys	39.74	7.01	11	4.39	o.75	16
Val	136.49	7.40	12	12.34	o.72	17
Met	99.14	9.42	12	5.34	o.28	17
Ile	51.33	3.54	12	5.87	o.25	17
Leu	33.95	2.32	12	8.95	o.46	17
Tyr	17.76	1.50	11	4.64	o.26	17
Phe	15.21	1.51	10	4.88	o.24	17
Orn	15.69	2.28	7	2.73	o.23	17
Lys	69.63	3.48	10	11.58	o.85	17
His	29.85	2.65	10	9.92	o.51	17
Arg	27.51	2.89	11	5.35	o.59	16

Tab. II Mittelwerte M und Standardabweichungen der Mittelwerte S_M der freien Aminosäuren im Stroma gesunder Augen und nach Abrasio in 10^{-8} Mol/g .

	gesund			24 h			48 h			72 h		
	M	S_M	n	M	S_M	n	M	S_M	n	M	S_M	n
Cys.ac.	20.69	3.02	16	8.66	1.81	6	6.24	o.57	6	43.73	4.31	4
Tau	209.48	11.02	17	46.54	4.44	6	54.51	1.58	5	41.74	3.14	4
Asp	17.09	1.21	17	12.20	3.71	6	8.29	o.53	5	9.86	o.33	4
Glu	41.06	3.39	17	28.33	4.45	6	28.84	1.88	6	30.76	o.91	5
Cit	4.10	o.37	17	3.11	o.49	6	1.84	o.30	5	2.25	o.30	5
Gly	71.22	6.72	17	66.26	16.20	6	38.02	4.88	5	48.84	5.97	5
Ala	53.18	2.28	17	22.75	3.55	6	25.36	1.46	5	33.29	2.69	5
Cys	6.12	o.88	16	4.51	1.02	6	2.86	o.72	5	3.93		1
Val	35.12	3.53	17	23.25	3.72	5	20.85	o.61	5	17.83	2.19	5
Met	18.78	1.86	17	11.13	1.06	4	12.11	o.46	5	8.28	o.60	5
Ile	14.23	1.05	17	7.49	1.30	4	7.37	o.46	5	9.24	1.06	5
Leu	12.82	o.95	17	4.68	o.44	4	5.81	o.31	5	10.11	1.66	5
Tyr	10.08	o.58	17	3.42	o.51	6	4.84	o.51	5	5.82	o.64	5
Phe	7.78	o.57	17	2.63	o.32	6	4.40	o.25	5	4.29	o.66	5
Orn	10.58	1.23	17	8.36	2.18	6	4.79	o.39	6	7.17	1.31	4
Lys	41.65	3.87	17	26.28	4.03	6	21.88	2.38	6	18.34	1.55	4
His	19.30	2.48	17	9.55	2.62	5	10.63	1.76	5	9.67	o.87	5
Arg	18.95	1.04	17	6.89	1.11	6	7.63	1.10	6	10.31	o.40	5

Tab. III Mittelwerte M und Standardabweichungen der Mittelwerte S_M der freien Aminosäuren im Kammerwasser gesunder Augen und nach Abrasio in 10^{-8} Mol/g .

	gesund			24 h			48 h			72 h		
	M	S_M	n	M	S_M	n	M	S_M	n	M	S_M	n
Cys.ac.	2.70	o.41	17	2.65	o.88	6	4.96	o.62	6	1.80	o.22	6
Tau	17.93	o.87	18	13.25	2.35	6	12.38	1.44	6	10.79	1.68	6
Asp	7.40	o.64	18	8.09	o.61	6	7.41	o.60	6	4.13	o.47	6
Glu	34.97	3.46	18	28.83	5.04	6	46.06	3.66	6	26.48	2.02	6
Cit	3.70	o.25	18	4.47	o.39	6	2.46	o.44	6	3.05	o.52	6
Gly	45.52	2.53	18	46.15	3.21	6	34.75	4.79	6	41.69	4.14	6
Ala	60.99	2.67	18	42.19	1.62	6	46.36	4.16	6	53.46	2.47	6
Cys	4.84	o.40	16	4.61	o.57	6	3.04	o.47	6	6.07	1.10	6
Val	23.19	1.79	17	22.39	o.69	6	21.86	2.18	6	17.42	3.47	6
Met	7.94	o.58	17	7.06	o.87	6	6.75	1.26	6	8.36	1.12	6
Ile	10.13	o.55	18	8.61	o.68	6	8.96	o.64	6	9.03	o.95	6
Leu	15.51	o.76	18	13.16	1.02	6	13.67	1.38	6	13.03	1.66	6
Tyr	14.20	o.77	17	8.78	o.97	6	12.24	1.44	6	12.56	o.49	6
Phe	12.00	o.50	17	7.91	o.29	6	10.60	1.02	6	9.89	1.31	6
Orn	6.56	o.53	18	5.88	o.47	6	5.40	o.85	6	5.15	o.65	6
Lys	32.66	1.61	18	26.90	1.59	6	27.77	2.71	6	29.86	1.69	6
His	16.18	o.84	18	12.62	1.00	6	12.94	1.35	6	11.41	1.68	6
Arg	20.81	2.42	18	22.05	1.94	6	17.65	2.29	6	12.47	3.24	5

Tab. IV Significanzberechnungen für Stroma und Kammerwasser (siehe 4.5.). Zufallswahrscheinlichkeit p (+/- Zu/Abnahme der Konzentration).

	STROMA			KAMMERWASSER		
	24 h/normal	48 h/24 h	72 h/48 h	24 h/normal	48 h/24 h	72 h/48 h
Cys.ac.	--- <0.0005	- <0.01	+++ <0.0005		+++ <0.0005	--- <0.0005
Tau	--- <0.0005	++ <0.0025	--- <0.0005	--- <0.0005		
Asp	-- <0.0025	- <0.025	+++ <0.0005	+ <0.025	- <0.05	--- <0.0005
Glu	--- <0.0005		+ <0.05	- <0.01	+++ <0.0005	--- <0.0005
Cit	--- <0.0005	--- <0.0005	+ <0.05	+++ <0.0005	--- <0.0005	+ <0.05
Gly		-- <0.0025	+ <0.01		--- <0.0005	+ <0.0125
Ala	--- <0.0005		+++ <0.0005	--- <0.0005	+ <0.025	++ <0.0025
Cys	-- <0.0025	- <0.01			--- <0.0005	+++ <0.0005
Val	--- <0.0005		- <0.01			- <0.0125
Met	--- <0.0005		--- <0.0005	- <0.025		+ <0.025
Ile	--- <0.0005		++ <0.005	--- <0.0005		
Leu	--- <0.0005	++ <0.0025	+++ <0.0005	--- <0.0005		
Tyr	--- <0.0005	++ <0.0025	+ <0.025	--- <0.0005	+++ <0.0005	
Phe	--- <0.0005	+++ <0.0005		--- <0.0005	+++ <0.0005	
Orn	- <0.025	-- <0.0025	++ <0.005	-- <0.005		
Lys	--- <0.0005	- <0.025	- <0.0125	--- <0.0005		
His	--- <0.0005			--- <0.0005		
Arg	--- <0.0005		+++ <0.0005		-- <0.0025	- <0.01

Tab. V Stroma/Kammerwasser-Konzentrationsquotient in gesunden Augen und nach Abrasio.

	normal	24 h	48 h	72 h	
Cys.ac.	7.66	3.27	1.26	24.29	
Tau	11.68	3.51	4.40	3.87	
Asp	2.31	1.51	1.12	2.39	
Glu	1.17	o.98	o.63	1.16	+
Cit	1.11	o.70	o.75	o.74	+
Gly	1.56	1.44	1.09	1.17	
Ala	o.87	o.54	o.55	o.62	
Cys	1.26	o.98	o.94	o.65	+
Val	1.51	1.04	o.95	1.02	(+)
Met	2.37	1.58	1.79	o.99	
Ile	1.40	o.87	o.82	1.02	+
Leu	o.83	o.36	o.43	o.78	
Tyr	o.71	o.39	o.40	o.46	
Phe	o.65	o.33	o.42	o.43	
Orn	1.61	1.42	o.89	1.39	+
Lys	1.28	o.98	o.79	o.61	+
His	1.19	o.76	o.82	o.85	+
Arg	o.91	o.31	o.43	o.83	

\+ normaler Konzentrationsgradient wird umgekehrt

Tab. VI Doppelte Fläche der einzelnen AS-peaks in den Eichkurven und ihre Standardabweichungen in cm^2 bei einer AS-Menge von jeweils 2×10^{-8} Mol . Es wurden am auf- und absteigenden Schenkel des peaks Tangenten angelegt, die mit der Grundlinie ein Dreieck bildeten, dessen Fläche als Fläche des peaks angesehen wurde.

	A	σ	$\sigma_{rel.}$
Cys.ac.	29.84	1.62	5.4 %
Tau	20.88	o.61	2.9 %
Asp	22.11	o.41	1.9 %
Glu	20.99	o.61	2.9 %
Cit	26.98	o.44	1.6 %
Gly	21.03	o.63	3.0 %
Ala	21.61	o.35	1.6 %
Cys	11.62	o.36	3.1 %
Val	23.65	1.40	5.9 %
Met	20.97	o.82	4.0 %
Ile	27.66	o.55	2.0 %
Leu	27.19	o.55	2.0 %
Tyr	24.40	o.50	2.0 %
Phe	24.49	o.78	3.2 %
Orn	30.80	o.54	1.8 %
Lys	31.26	o.66	2.1 %
His	26.32	o.66	2.5 %
Arg	27.96	1.57	5.6 %

A = doppelte Dreiecksfläche (= Grundlinie x Höhe)

σ = Standardabweichung

$\sigma_{rel.}$ = relative Standardabweichung

Tab. VII Verwendete Geräte

A. für die Probenaufbereitung

1. Heraeus-Christ Labofuge III
2. Mettler Analysenwaage H 54
3. WKF Kryofix
4. Edward High Vacuum Ltd. Speedivac
5. Büchi Rotavapor

B. für die Herstellung der Lösungen (siehe Tab. VIII)

1. Mettler Schnellwaage P 1200
2. Heidolph Magnetrührer 1000 U/min
3. Knick pH-Meter

C. für die Eluationschromatographie

1. Labotron Präzisionspumpen
2. Beckman Photometer DB
3. Beckman Laborschreiber

Tab. VIII Verwendete Lösungen

1. Puffer

pH	3.23	4.25	4.20	5.25
Citronensäure	42.0 g	42.0 g	53.2 g	49.1 g
NaOH	16.5 g	16.5 g	31.2 g	28.8 g
HCl 32%	25.0 ml	10.0 ml	38.0 ml	13.6 ml
Phenol	2.0 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g
Thiodiglykol	10.0 ml	10.0 ml	-	-
BRIJ-Lösung	10.0 ml	10.0 ml	10.0 ml	10.0 ml

2. BRIJ-Lösung

50 g BRIJ (= Polyäthylenglykolmonoauryläther) werden bei 80 - 100 °C in 100 ml aqua dest. gelöst

3. Ninhydrinlösung

200 mg Zinnchlorid und 10 g Ninhydrin werden in 375 ml Methylglykol gelöst und 15 min mit Stickstoff durchperlt. Man gibt 125 ml Acetatpuffer pH 5.51 dazu und durchperlt weitere 15 min mit N_2 .

4. Acetatpuffer pH 5.51

680 g Natriumacetat·3 H_2O und 125 ml Essigsäure 99 - 100% werden mit aqua dest. auf 1.25 l aufgefüllt.

9. Literaturverzeichnis

Bier, N. — A study of the cornea
Brit. J. physiol. Opt. N.S. 13
1956, S. 79 - 92

Boeck, H. — Über Metabolitspiegel im Kammerwasser und im Corneaparenchym nach Entfernung des Epithels
Inaug.-Dissertation, Marburg 1971

Cogan, D.G. — zitiert in Graymore, C.N.
Biochemistry of the eye
Academic Press London New York 1970
S. 548

Davson, H. — The eye - vegetative physiology and biochemistry
Academic Press London New York 1962
S. 83 - 91 , S. 340 - 347

Documenta Geigy — Wissenschaftliche Tabellen 6. Auflage
J.R. Geigy AG Pharma Basel 1960 S. 32

Dohlman, C.H. — The function of the corneal epithelium in health and disease
Investig. Ophthal. 10 1971 S. 383 - 407

Domeier, A. — Veränderungen der Aminosäurekonzentrationen bei intravitrealem Platinfremdkörper in Glaskörper und Kammerwasser des Kaninchens
Inaug.-Dissertation, Marburg 1973

Duke-Elder, Sir St. — The healing of the epithelium
In: System of Ophthalmology
Vol. III part 2 London 1965
S. 604 - 614

Friedenwald, J.S. — zitiert in Graymore, C.N.
Biochemistry of the eye
Academic Press London New York 1970
S. 110

Graymore, C.N. — The Cornea
In: Biochemistry of the eye
Academic Press London New York 1970
S. 1 - 94

Graymore, C.N. — The constituents of the normal aqueous
In: Biochemistry of the eye
Academic Press London New York 1970
S. 115 - 124

Grodau, H. — Über das Verhalten der Hexokinase aus dem Corneaepithel bei Änderung der Substratkonzentrationen - Untersuchungen bei Kaninchen und Rind
Inaug.-Dissertation, Marburg 1973

Henninghausen, U. F.W. Schmidt-Martens, M. Reim — Metabolitspiegel und Enzymaktivitäten des energieliefernden Stoffwechsels im regenerierenden Corneaepithel
DOG 71. Zusammenkunft 1972 S. 95 - 99

Herrmann, H. D.S. Love — An autoradiographic demonstration of the effect of corneal epithelium on amino acid incorporation into the insoluble constituents of the corneal stroma
J.Biophys.Biochem.Cytolog. 6/135 1959

Lehninger, A.L. Analysis of amino acid mixtures
In: Biochemistry 2nd edition
Worth Publishers Inc. New York 1975
S. 86 - 92

Mössinger, V. Veränderungen der AS-Konzentrationen bei intravitrealem Eisenfremdkörper in Glaskörper und Kammerwasser des Kaninchenauges
Inaug.-Dissertation, Marburg 1970

Pedler, C. The fine structure of the corneal epithelium
Exp.Eye Res. 1 1962 S. 286 - 289

Pinstock, D. Experimentelle Untersuchungen und Berechnungen von Veränderungen der Glucose-Blut-Kammerwasser-Barriere nach Verätzung des Kaninchenauges
Inaug.-Dissertation, Marburg 1976

Reddy, V.N. Steady state distribution of free amino acids in the aqueous humors, vitreus body and plasma of the rabbit
Exp.Eye Res. 1 1961 S. 175 - 181

Reddy, V.N. Distribution of free amino acids and related compounds in rabbit cornea
Ophthal.Res. 1 1970 S. 48 - 57

Reim, M. Warum ist die Hornhaut durchsichtig?
DOG 71. Zusammenkunft 1972 S. 58 - 75

Reim, M.
K. Bittmann
H. Kilp
Die Untersuchung von Metabolitspiegeln im Kammerwasser, im Glaskörper, in der Hornhaut und in der Bindehaut unter verschiedenen experimentellen Bedingungen und die Auswertung der Ergebnisse mit einem einfachen Computerprogramm
Doc.Ophthal. 27 1969 S. 137 - 143

Reim, M.
H. Cattepoel
K. Bittmann
H. Kilp
Methodische und physiologische Aspekte bei der statistischen Auswertung von Metabolitspiegeln in verschiedenen Kompartimenten der vorderen Augenabschnitte
A.v.Graefes Arch.klin.exp.Ophthal. 177 1969 S. 355 - 368

Reim, M.
J. Friend
C.H. Dohlman
Zur Ernährung der Hornhaut mit einer wasserdurchlässigen Membran als künstliches Endothel
DOG 69. Zusammenkunft 1968 S. 546 - 550

Reim, M.
F. Lax
H. Lichte
R. Turss
Steady state levels of glucose in the different layers of the cornea, aqueous humor, blood and tears in vivo
Ophthalmologica 154 1967 S. 39 - 50

Reim, M.
H. Lichte
Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Hornhauttrübung
A.v.Graefes Arch.klin.exp.Ophthal. 168 1965 S. 365 - 377

Reim, M.
D. Meyer
Über Veränderungen von Metabolitgehalten im Corneaepithel in Anaerobiose
A.v.Graefes Arch.klin.exp.Ophthal. 174 1967 S. 103 - 109

Reim, M.
F. Schmidt
D. Meyer
Die Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel verschiedener Säugetiere
DOG 67. Zusammenkunft 1965 S. 164 - 171

Reim, M.
E. Schütte
H. Cattepoel
Experimentelle Variation der Spiegel einiger Metabolite in der Cornea
DOG 71. Zusammenkunft 1972 S. 84 - 87

Reim, M.
E. Schütte
H. Cattepoel
Änderungen der Glucosespiegel in Kammerwasser und Cornea nach Verödung des Ciliarkörpers
DOG 71. Zusammenkunft 1972 S. 345 - 347

Rohen, J.W.
Das Sehorgan
In: Handbuch der Primatenkunde II Teil 1 Lieferung 6 Verlag S. Karger Basel New York 1962 S. 151

Schmidt-Martens, F.W.
Die Lipide im Kammerwasser des Rinderauges und ihre Rolle als potentiell nutritive Substrate für die Cornea
DOG 71. Zusammenkunft 1972 S. 91 - 95

Schmidt-Martens, F.W.
H.J. Hohorst
Free fatty acids in bovine cornea and corneal epithelium
Ophthal.Res. 3 1972 S. 126 - 128

Schütte, E.
Nutritive Metabolite in den vorderen Augenabschnitten. Untersuchungen im Modellexperiment und beim Menschen
Habilitationsschrift, Aachen 1976

Schütte, E.
M. Reim
Metabolite und Hydratation der Kaninchenhornhaut
A.v.Graefes Arch.klin.exp.Ophthal. 187
1973 S. 131 - 136

Schütte, E.
I. Schulz
M. Reim
Cornea nutrition by intraveneous glucose infusion
A.v.Graefes Arch.klin.exp.Ophthal. 185
1972 S. 161 - 169

Schütte, E.
R.D. Werner
M. Reim
Intraveneous fructose infusion
Ophthal.Res. 7 1975 S. 73 - 79

Schwarz, W.
Cornea
DOG 71. Zusammenkunft 1972 S. 12 - 18

Spackman, D.H.
W.H. Stein
S. Moore
Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids
Anal.Chem. 30 1958 S. 1190 - 1206

Stadler, G.
Postmortale Änderung der Konzentration von Aminosäuren, Glucose, Lactat und Pyruvat im Kammerwasser und Glaskörper
Inaug.-Dissertation, Marburg 1975

Steindorf, K.
zitiert in Graymore, C.N.
Biochemistry of the eye
Academic Press London New York 1970
S. 110

Turss, R.
K. Boden
G. Fehring
Die Hornhauternährung bei Laugenverätzung und der Einfluß von Tolazolin (Priscol^{R})
A.v.Graefes Arch.klin.exp.Ophthal. 190
1974 S. 155 - 163

Turss, R.
J. Friend
M. Reim
C.H. Dohlman
Glucose concentration and hydration of the corneal stroma
Ophthal.Res. 2 1971 S. 253 - 260

Turss, R.
H. Schebitz
Die Bedeutung des Kammerwassers und der Randschlingengefäße für die Ernährung der Hornhaut
DOG 71. Zusammenkunft 1972 S. 87 - 91

Waitzman, B.
W.R. Bailey
C.G. Kirby
Chromatographic analysis of biologically active lipids from rabbit irides
Exp.Eye Res. 6 1967 S. 130 - 137

Welge-Lüssen, L.
Eluationschromatographische Aminosäureuntersuchungen im Glaskörper
DOG 68. Zusammenkunft 1967 S. 102 - 107

Welge-Lüssen, L.
A. Domeier
Aminosäuren im Glaskörper nach intravitrealer Platinsplittereinpflanzung
DOG 71. Zusammenkunft 1972 S. 411 - 416

Welge-Lüssen, L.
J.-Ch. Gerstner
Experimentelle Verätzungen und ihr Einfluß auf den Aminosäurengehalt in Cornea und Kammerwasser
DOG 74. Zusammenkunft 1974 S. 619 - 625

Welge-Lüssen, L.
W. Oppermann
Aminosäurebestimmungen an Einzelaugen in Kammerwasser und Glaskörper
A.v.Graefes Arch.klin.exp.Ophthal. 177 1969 S. 346 - 354

Wenske, R.
Aminosäurekonzentrationen in Cornea (Stroma) und Kammerwasser von gesunden Kaninchenaugen und ihre Veränderungen nach Vereisung der Hornhaut
Inaug.-Dissertation, Marburg 1974

Herrn Prof. Dr. med. L. Welge-Lüssen gilt mein besonderer Dank für die Stellung des Themas sowie für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Dem Direktor der Universitäts-Augenklinik Marburg/Lahn , Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. W. Straub, danke ich für die Möglichkeit, in seiner Klinik zu arbeiten.

Frau Cattepoel möchte ich für die praktische Hilfe im Labor danken.

Herrn Prochazka danke ich für die Anfertigung der graphischen Darstellungen, Frau Ursprung und Herrn Ross für die Herstellung der Photographien.

Herrn Prof. Dr. med. M. Reim danke ich für die Übernahme des Correferates.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

In Marburg: Amon, Braasch, Buchholz, Dittrich, Dombrowski, Egbring, Exner, Friederich, Gerdes, Haberich, Hamelmann, Hardewig, Heene, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Kaffarnik, Karlson, Kleinsasser, Koransky, Mannheim, Maroske, Martini, Massarat, Petry, Rodeck, Schachtschabel, Schmitz-Moormann, Siegert, Solcher, Straub, Stutte, Welge-Lüssen, Wendt, Willenbockel.

Lebenslauf

Geboren:	28.2.53 in Mönchengladbach
Eltern:	Arzt Dr. med. Günter Leube Ärztin Dr. med. Gisela Leube geb. Höing
Schulische Ausbildung:	Freudenthal-Volksschule Soltau/Han. Wittekindt-Gymnasium Lübbecke/Westf. Hohenstaufen-Gymnasium Kaiserslautern Abitur im Mai 1971 in Kaiserslautern
Studium:	Okt. 1971 - Okt. 1972 Studium der Chemie in Marburg seit Okt. 1972 Studium der Humanmedizin in Marburg August 1973 Naturw. Vorprüfung Sept. 1974 Ärztliche Vorprüfung August 1975 1. Teil d. Staatsexamens August 1977 2. Teil d. Staatsexamens